

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **06094718 A**

(43) Date of publication of application: **08 . 04 . 94**

(51) Int. Cl. **G01N 33/543**
G01N 30/90

(21) Application number: **04267789**

(22) Date of filing: **11 . 09 . 92**

(71) Applicant: **DAICHI RAJIO ISOTOPE
KENKYUSHO:KK**

(72) Inventor: **YAMAGUCHI TOSHIRO
HATSUSHIBA KIYONORI
KUROSAWA HIROYUKI**

(54) **IMMUNOCHROMATOGRAPHY AND DEVICE FOR
IT**

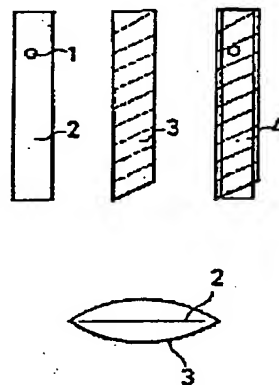
(57) Abstract:

PURPOSE: To eliminate the need for separating cell constituents and to analyze constituents in blood using whole blood by a development support where the development rate of the cell constituent differs from that of a liquid constituent.

CONSTITUTION: After a specimen is developed into a development support 2 by an antigen or an antibody where gold colloid is connected by the immunochromatography, generation of an antigen antibody reaction is judged according to the presence or absence of the integration of the gold colloid. Then, the development support 2, where the development rate of the cell constituent differs from that of the liquid constituent, is used. For immobilizing the antigen or antibody for the development support 2, an antigen or antibody liquid solution may be spotted and adsorbed. A spot position 1 should be the one where a complex of a substance to be measured and a gold colloid reagent passes and the cell constituent does not reach. Also, since the gold colloid reagent which is developed to the development support 2 rises while being uniformly dissipated on the development support 2, the spot position 1 should be at a low position where more gold colloids pass for

improved sensitivity. The section of a sheath 3 is in lemon shape, thus protecting the inside development support and preventing a capillary phenomenon at the flat surface part of the development support.

COPYRIGHT: (C)1994,JPO&Japio



1. 10-10-10 11:00 AM 10-10-10 11:00 AM 10-10-10 11:00 AM

2. 10-10-10 11:00 AM 10-10-10 11:00 AM 10-10-10 11:00 AM

3. 10-10-10 11:00 AM 10-10-10 11:00 AM 10-10-10 11:00 AM

THIS PAGE BLANK (USPTO)

10-10-10 11:00 AM 10-10-10 11:00 AM 10-10-10 11:00 AM

10-10-10 11:00 AM 10-10-10 11:00 AM 10-10-10 11:00 AM

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-94718

(43)公開日 平成6年(1994)4月8日

(51)Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/543		P 9217-2 J		
		Q 9217-2 J		
30/90		8310-2 J		

審査請求 未請求 請求項の数7(全 5 頁)

(21)出願番号 特願平4-267789

(22)出願日 平成4年(1992)9月11日

(71)出願人 000149837

株式会社第一ラジオアイソトープ研究所
東京都中央区京橋一丁目17番10号

(72)発明者 山口 敏朗

千葉県印旛郡富里町日吉台3-26-5

(72)発明者 初芝 清徳

千葉県千葉市中央区村田町893-64

(72)発明者 黒澤 裕之

千葉県山武郡松尾町下大蔵447-3

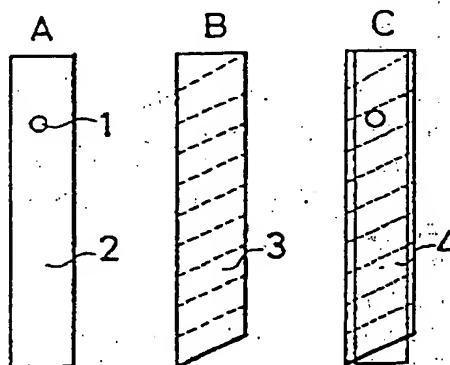
(74)代理人 弁理士 小野 信夫 (外1名)

(54)【発明の名称】 免疫クロマト試験方法およびこれに用いる試験具

(57)【要約】

【構成】 金コロイドを結合した抗原または抗体を利用し、検体を展開支持体に展開させた後、金コロイドの集積の有無により抗原抗体反応の生成を判定する免疫クロマト法において、細胞成分と液性成分の展開速度が相違する展開支持体を用いたことを特徴とする免疫クロマト法およびこれに用いる試験具。

【効果】 本発明は、展開支持体として、細胞成分と液性成分の展開速度が相違するものを選択使用しているため、免疫クロマト法を行うにあたり、細胞成分を分離する必要がない。従って、緊急を要する場合や、十分な設備のない状況下においても容易に全血を用い、血液中成分の分析をおこなうことができるので、各種の疾患の診断に極めて有用である。



【特許請求の範囲】

【請求項1】金コロイドを結合した抗原または抗体を利用し、検体を展開支持体に展開させた後、金コロイドの集積の有無により抗原抗体反応の生成を判定する免疫クロマト法において、細胞成分と液性成分の展開速度が相違する展開支持体を用いたことを特徴とする免疫クロマト法。

【請求項2】測定すべき物質に対する抗体を結合した金コロイドを用い、展開支持体の適当な位置に測定すべき物質に対する抗体を固定したことを特徴とする請求項第1項記載の免疫クロマト試験方法。

【請求項3】測定すべき抗体に対する抗原を結合した金コロイドを用い、展開支持体の適当な位置に測定すべき抗体に対する抗原を固定したことを特徴とする請求項第1項記載の免疫クロマト試験方法。

【請求項4】被検試料が全血試料である請求項第1項記載の免疫クロマト試験方法。

【請求項5】細胞成分と液性成分の展開速度が相違する展開支持体が、ガラス繊維にシリカゲルを含浸させて調製されたものである請求項第1項記載の免疫クロマト試験方法。

【請求項6】細胞成分と液性成分の展開速度が相違する展開支持体が、有機バインディング処理を施したガラス繊維濾紙である請求項第1項記載の免疫クロマト試験方法。

【請求項7】細胞成分と液性成分の展開速度が相違する展開支持体の適当な位置に測定すべき物質と抗原抗体反応を起こす抗体または抗原を固定し、当該展開支持体をその断面がほぼレモン型ないし紡錘型である鞘に収納してなる試験具。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、免疫クロマト試験方法およびこれに用いる試験具に関し、更に詳細には、全血試料から細胞成分を分離しなくても目的物質の存在を肉眼的に判定することの出来る免疫クロマト試験方法およびこれに用いる試験具に関する。

【0002】

【従来の技術】従来より、エンザイムリンクドイムノッセイ(ELISA)、エンザイムイムノアッセイ(EIA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、凝集法、免疫クロマト試験法等の抗原抗体反応を利用した生体内成分の分析法は良く知られている。このうち、免疫クロマト試験法として、抗原または抗体と結合した金コロイド(以下、「金コロイド試薬」という)を利用した方法が知られている。

【0003】しかし、この方法は、金コロイド試薬が一定の部分に集まったことにより目的物質の存在を判断するものであるため、全血試料への適用は極めて難しいとされていた。すなわち、全血試料は、赤血球、白血

球、血小板等の細胞成分と、液性成分から構成されているが、全血試料を用いた場合、金コロイドの存在が肉眼で判定できないという欠点があり、遠心分離等により液性成分を分離することが必須とされていた。

【0004】このような分離は、設備の整った病院等ではなんら問題無く行なうことが可能であるが、そのような設備のない環境で、緊急に試験を行わなくてはならない場合も多くその解決が求められていた。

【0005】近年、全血試料を用いた免疫クロマト試験方法として、抗原または抗体を固定化させた試験バンドを有する展開支持体の下端と試験バンドの間に全血試料をスポットし、次いで下端から金コロイド試薬を含む緩衝液を展開させ、試験バンドでの金コロイドの集積を判定する方法が報告されている(特開昭.63-25553号)。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、この方法では、全血試料のスポット量により結果が変化することがあり、しかもそのスポット量が少ないため、かなりの熟練が要求され、簡易な方法とはいえない。より簡便で実用性の高い方法の提供が求められていた。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者は上記の実情に鑑み、免疫クロマト試験方法を改良すべく鋭意研究を行なった結果、特定の展開支持体は血液中の細胞成分と液性成分の展開速度に大きな相違があること、そして、当該展開支持体の液性成分は展開するが細胞成分は展開しない位置に判定部位を設けることにより、細胞成分におおわれる事なく金コロイドの集積を肉眼で観察が可能となり全血試料そのままでも免疫クロマト試験方法が行なえることを見出し、本発明を完成した。

【0008】

すなわち、本発明の第一の目的は、金コロイドを結合した抗原または抗体を利用し、検体を展開支持体に展開させた後、金コロイドの集積の有無により抗原抗体反応の生成を判定する免疫クロマト法において、細胞成分と液性成分の展開速度が相違する展開支持体を用いたことを特徴とする免疫クロマト法を提供するものである。また、本発明の第二の目的は、上記方法の実施に利用することのできる試験具を提供するものである。

【0009】本発明において使用される細胞成分と液性成分の展開速度が相違する展開支持体の例としては、一般にインスタント薄層クロマトグラフィとして知られるガラス繊維にシリカゲルを含浸させて調製された展開支持体や有機バインディング処理を施したガラス繊維濾紙により調製された展開支持体が挙げられ、これらの具体例としては、インスタント薄層クロマトグラフィ(ITLC;ゲルマンサイエンス社製)やガラス繊維濾紙GS-2.5(アドバンテックトーヨー社製)として市販されているもの等が挙げられる。

【0010】また、本発明で用いる金コロイド試薬は既

に免疫クロマト試験方法で採用されているものを利用することができる。この金コロイド試薬の調製は、市販されている金コロイドに、抗体または抗原を吸着させれば良い。

【0011】展開支持体に対する抗原または抗体の固定は、抗原または抗体溶液をスポットし、非特異的に吸着させれば良い。

【0012】本発明において、抗原または抗体溶液をスポットした位置（以下、「スポット位置」という）は、細胞成分が展開する位置であって、肉眼による金コロイド試薬の凝集の判別が困難になり、意味がないので、スポット位置は、測定すべき物質と金コロイド試薬の複合体は通過し、かつ、細胞成分が到達しない位置とすることが必要である。また、展開支持体に展開された金コロイド試薬は、その全部が展開支持体の上端まで上昇するのでなく、展開支持体上に均一に分散されながら上昇していくのであるから、スポット位置をより多くの金コロイドが通過するなるべく低い位置（細胞成分の上昇する最上端の近く）とする方が感度が良く、好ましい。

【0013】この位置決定に関連する要素としては、サンプル量（展開液量）、サンプルの種類（ヘマトクリット値、種差等）、金コロイド試薬液量、展開支持体の幅と厚さ、測定時間等が挙げられ、好ましくは実験的に定められるべきである。

【0014】なお、本発明方法においては、測定試料中の抗原または抗体の非特異的吸着を少なくするため、抗原または抗体溶液をスポットした展開支持体全体を、例えば、牛血清アルブミン、脱脂粉乳、カゼイン等でブロックすることが好ましい。

【0015】本発明方法で用いる展開支持体は、破損しやすいので、その実施に当っては図1に示すような試験具を用いることが好ましい。

【0016】同図中、Aは展開支持体を、Bはそれを保護する鞘を、Cは展開支持体を鞘に収納した状態（本発明試験具）を示す。また、図1中、1はスポット位置を、2は展開支持体を、3は鞘をそれぞれ示す。本図中の鞘は、斜めの切れ込みをいれ、検体の展開（吸収）をよくしているが、そのような形状に限らず、隙間を形成したり1個ないし複数個の穴を設け検体の展開を良くしても良い。

【0017】図2は、本発明試験具の断面を示す図面である。鞘3の断面はほぼレモン形をしているので、中に入っている展開支持体を有効に保護するとともに展開液成分の平面部での意図しない毛管現象を防ぐことが可能となる。

【0018】図3は、本発明の試験具の使用状態を示す図面である。図中、5は試験管であり、その中に所定量の全血試料と金コロイド試薬の混合検体6を取り、これに本発明試験具4を入れ、検体を下端から展開させる。

【0019】図4は、上記の本発明試験具を用いて行う免疫クロマト法を模式的に示した図面である。

【0020】同図中、Aは、被検試料中の抗体を測定する場合を示したものである。この図の場合は、被検試料中に存在する測定すべき抗体8（被検抗体）に対する抗原9をまず取得し、これの一部は金コロイドと結合させ、他の1部は展開支持体2にスポットし固定する。次いで、金コロイドと結合した抗原9（金コロイド試薬）を被検試料中に加えて検液とすると、この系内で被検抗体8と金コロイド試薬が反応し、金コロイド-抗体複合体が形成される。更に、この検液を本発明試験具の下端につけると、検液は展開支持体中を展開するが、前記の金コロイド-抗体複合体はスポット位置に到達したとき、更に複合体中の抗体8が固定された抗原9と結合するので、ここで展開を止める。そして、検体中に一定量以上の抗体8が存在した場合、スポット位置に金コロイドが蓄積し、肉眼でも判別できるようになり、被検試料中の抗体8の存在が示される。

【0021】また、図中Bは、被検試料中の抗原を測定する場合を示したものである。この図の場合は、被検試料中に存在する抗原10（被検抗原）に対する抗体11をまず取得し、以下、上記と同様にすれば、被検試料中の被検抗原が測定できる。

【0022】本発明方法によれば、血液中に存在する各種の成分、例えば、ホルモン、酵素、免疫グロブリン（種々の抗原に対する抗体）、ビタミン類、リポ多糖類、タンパク質および核酸、アミノ酸類、ポリペプチド類、アルカロイド類、ステロイド類、アミノグルコシド類、補体因子および血液凝固因子、上記以外の医薬代謝物、中間代謝産物およびその誘導体とそれらのレセプターまたは結合物質等を全血中から検出、分析することが可能である。

【0023】【発明の効果】本発明は、展開支持体として、細胞成分と液性成分の展開速度が相違するものを選択使用しているため、免疫クロマト法を行うにあたり、細胞成分を分離する必要がない。従って、緊急を要する場合や、十分な設備のない状況下においても容易に全血を用い、血液中成分の分析をおこなうことができるので、各種の疾患の診断に極めて有用である。

【0024】【実施例】次に実施例を挙げ、本発明を更に詳しく説明する。これは、本発明を限定するものではない。

【0025】実施例 1

マウスイムノグロブリン結合金コロイドの調製：
粒径15nmの金コロイド溶液（サイメッド社製）60.0μlに、0.2M炭酸カリウム溶液11μlを添加してpH9.0とした。このpH調製金コロイド溶液61.5μlに、マウスイムノグロブリン溶液（2.5mg/

ml、ザイメッド社製、0.02Mリン酸緩衝液、pH 6.4、0.02%アジ化ナトリウムを含む)を蒸留水で0.1mg/mlに調製した物を60 μ l添加(必要量の2倍量)した。

【0026】この混合物を振盪撹拌後、安定化剤として10mMリン酸緩衝液(pH 6.4、1%牛血清アルブミン、0.05%アジ化ナトリウムを含む)600 μ lを添加した。高速遠心機(クボタ6800)にて14500回転/分で60分間遠心し、上澄みを除去した。沈澱物を10mMリン酸緩衝液(pH 6.4、1%牛血清アルブミン、0.05%アジ化ナトリウムを含む)100 μ lに再浮上させ、マウスイムノグロブリン結合金コロイドを得た。

【0027】実施例 2

本発明試験具の調製：インスタント薄層クロマトグラフィー(200mm \times 50mm：ゲルマンサイエンス社製)上に110mm \times 5mmの切取線を書き、10キット分を同時作製した。一端から6cmの所にマウスイムノグロブリン(2.5mg/ml、ザイメッド社製、0.02Mリン酸緩衝液、pH 6.4、0.02%アジ化ナトリウムを含む)をビベッターを用いて3 μ l滴下した。滴下したマウスイムノグロブリンが乾燥する前にこれを0.02Mリン酸緩衝液(pH 6.4、1%牛血清アルブミン、4%サッカロースを含む)中に約30分間浸した。

【0028】蒸留水中で3回洗浄後、乾燥器(約40℃)中にて2時間ほど乾燥させた後、インスタント薄層クロマトグラフィーを110mm \times 5mmに切り離した。同時に直径4mm、長さ130mmの円筒状のポリエチレン製チューブをインスタント薄層クロマトグラフ*30

表 1

試 料	判定結果
対 照 試 料	陰 性
60 倍希釈試料	陽 性
250 倍希釈試料	陽 性
1000 倍希釈試料	陽 性

【0033】上記試験においては、細胞成分は下端から5cm、液性成分は11cmまで上昇し金コロイドの凝集位置と細胞成分を区別でき、明確に判定できた。マウスイムノグロブリンのスポット位置は下端から6cmの所であり、その部分に金コロイドの凝集(紫色として出現)を確認したものを陽性と判定した。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明試験具の構成を示す図面。図中、Aは展開支持体を、Bはそれを保護する鞘を、Cは展開支持体を鞘に収納した状態(本発明試験具)を示す。

【図2】 本発明試験具の断面を示す図面。

*ィーのサイズに合せてその断面がほぼレモン型ないし紡錘型になる鞘状に圧変した。尚、鞘は全血試料と接触する部分に切り込みが入れてあり、その部分を下端とした。下から6cmの所に抗体のコーティングポイントがくる向きに展開用支持体を鞘中に装着し、本発明試験具を調製した。

【0029】実施例 3

細胞成分を含む全血試料を用いての家兎抗マウス抗体測定試験：実施例1で調製したマウスイムノグロブリン結合金コロイドと実施例2で調製した本発明試験具を用いて、以下に示す方法により家兎抗マウス抗体の検出試験を行った。

【0030】(測定方法)

家兎(ニュージーランドホワイト種)耳介動脈より採取した全血(ヘパリン処理)を用い、アフィニティー精製された家兎抗マウス抗体溶液(1mg/ml、カッペル社製、#0611-0082)を60倍、250倍、1000倍に希釈して計3種類の被検試料を調製した。また、家兎抗マウス抗体を添加しないものを対照試料とした。

【0031】ポリスチレン製チューブ(ϕ :14mm、H:70mm)を4本用意し、それぞれに被検試料および対照試料200 μ lを添加した。続いて、これに実施例1で調製したマウスイムノグロブリン結合金コロイド20 μ lを添加し、軽く混和した。実施例2で調製した本発明試験具をチューブ内に立て、室温放置した。約30分放置後、金コロイドの凝集程度(紫色として出現)を観察した。この結果を表1に示す。

【0032】(測定結果)

【図3】 本発明の試験具の使用状態を示す図面。

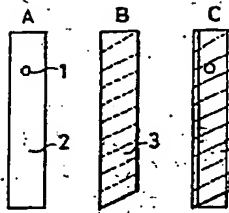
【図4】 本発明の免疫クロマト法の機構を模式的に示した図面。

【符号の説明】

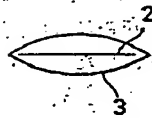
- | | |
|----------|-----------|
| 1 スポット位置 | 7 金コロイド |
| 2 展開支持体 | 8 抗体 |
| 3 鞘 | 9 8の抗原 |
| 4 本発明試験具 | 10 抗原 |
| 5 試験管 | 11 10に対する |
| 抗体 | |
| 6 検体 | |

以 上

【図1】



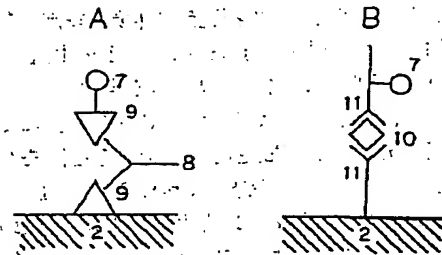
【図2】



【図3】



【図4】



項目	内容
1	発明の名称
2	発明の要旨
3	発明の背景
4	発明の概要

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ALL INFORMATION CONTAINED
HEREIN IS UNCLASSIFIED
DATE 10-10-2001 BY 60322
EXCEPT WHERE SHOWN
OTHERWISE IN THIS DOCUMENT
IT IS THE POLICY OF THE
NATIONAL ARCHIVES AND
RECORDS ADMINISTRATION
TO RELEASE ALL INFORMATION
WHICH IS NOT LAWFULLY
RESTRICTED FROM PUBLIC
ACCESS